

PATENT

Attorney Docket No.: 032301WD205

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants: Brigitte BATHE, et al.)

Serial No.: New 091942,936)

Group Art Unit: Unassigned

Filed: August 31, 2001)

Examiner: Unassigned

For: NUCLEOTIDE SEQUENCES WHICH CODE FOR THE sigH GENE

CLAIM FOR FOREIGN PRIORITY

RECEIVED

MAR 14 2002

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

TECH CENTER 1600/2900

Dear Sir:

Under the provisions of Section 119 of 35 U.S.C., Applicants hereby claim the benefit of German Application No. DE 101 33 427.3 filed in Germany on July 10, 2001 relating to the above-identified United States patent application.

In support of Applicants' claim for priority, a certified copy of said German application is attached hereto.

Respectfully submitted,

SMITH, GAMBRELL & RUSSELL, LLP

By: _____


Robert G. Weilacher, Reg. No. 20,531
1850 M Street, N.W., Suite 800
Washington, D.C. 20036
Telephone: (202) 659-2811
Facsimile: (202) 263-4329

October 30, 2001

1652

PATENT

Attorney Docket No.: 032301WD205

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants: Brigitte BATHE, et al.)

Serial No.: New 09/912,936)

Group Art Unit: Unassigned

Filed: August 31, 2001)

Examiner: Unassigned

For: NUCLEOTIDE SEQUENCES WHICH CODE FOR THE sigH GENE

TRANSMITTAL LETTER

RECEIVED

Commissioner For Patents
Washington, DC 20231

MAR 14 2002

Dear Sir:

TECH CENTER 1600/2900

Transmitted herewith is:

ITEM(S)	FEE
• <i>Claim for Foreign Priority; and</i>	<i>None</i>
• <i>Certified copy of German Application DE 101 33 427.3</i>	<i>None</i>

- No fees are being paid with this filing.

Respectfully submitted,

SMITH, GAMBRELL & RUSSELL, LLP

By :

Robert G. Weilacher - Reg. 20,531
1850 M Street, N.W., Suite 800
Washington, D.C. 20036
Telephone: (202) 263-4300
Facsimile: (202) 263-4329

Dated: October 30, 2001

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



#10



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 33 427.3
Anmeldetag: 10. Juli 2001
Anmelder/Inhaber: Degussa AG,
Düsseldorf/DE
Bezeichnung: Für das sigH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen
Priorität: 02.09.2000 DE 100 43 333.2
IPC: C 12 N, C 07 H, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 27. September 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Ebert".

Ebert

Für das sigH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das sigH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren

5 unter Verwendung von Bakterien, in denen das sigH-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie

10 und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der

15 Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die

20 Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser

25 Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und Aminosäuren produzieren.

30 Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene

amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue

- 5 Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich

10 ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist Lysin.

15 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das sigH-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit
20 einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
identisch ist mit der Aminosäuresequenz von
25 SEQ ID No. 2,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

30

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Sigma-Faktors H aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine

5 replizierbare DNA handelt, enthaltend:

(i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1,
oder

(ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i)
innerhalb des Bereichs der Degeneration des
10 genetischen Kodes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz
(i) oder (ii) komplementären Sequenz
hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

15 Weitere Gegenstände sind

ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA,
enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1
dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die
20 Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt,
enthält;

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid,
insbesondere Pendelvектор oder Plasmidvektor, und

coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten oder in
25 denen das sigH-Gen verstärkt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums,

die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

- 5 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für den Sigma-Faktor H kodieren, oder um solche
- 10 Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des sigH-Gens aufweisen. Sie sind ebenso zum Einbau in sogenannte „arrays“, „micro arrays“ oder „DNA chips“ geeignet, um die entsprechenden Polynukleotide zu
- 15 detektieren und zu bestimmen.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für den Sigma-Faktor H

- 20 kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 25, 26, 27, 28, 29 oder 30, bevorzugt mindestens 20, 21, 22, 23 oder 24, ganz besonders bevorzugt mindestens 15, 16, 17, 18 oder 19 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 oder 40, oder mindestens 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 oder 50 Nukleotiden. Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 100, 150, 200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

- 5 Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90%, und
10 ganz besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene
15 Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität des Sigma-Faktors H und auch solche ein, die zu wenigstens 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90%, und ganz besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur
25 fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-
30 Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das sigH-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise

5 die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Durch die Maßnahmen der Verstärkung, insbesondere

10 Überexpression, wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen um mindestens 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% oder 500%, maximal bis 1000% oder 2000% bezogen auf die des Wildtyp-Proteins beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration

15 des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus erhöht.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann

20 sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

25 Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
30 *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870
 Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
 Corynebacterium melassecola ATCC17965
 Brevibacterium flavum ATCC14067

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten bzw. Stämme.

- 5 Den Erfindern gelang es, das neue, für das Enzym Sigma-Faktor H kodierende sigH-Gen von *C. glutamicum* zu isolieren.

Zur Isolierung des sigH-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses

- 10 Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, 15 Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ-Vektoren angelegt wurde.
- 20 Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 25 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326) (1992) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pHC79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)).

- 30 Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich

besonders solche *E. coli* Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5αmcr, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) 5 beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy 10 of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von 15 Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Auf diese Weise wurde die neue für das Gen sigH kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID No. 20 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des sigH-Genproduktes 25 dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID 30 30 No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner 35 grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins

führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschrifte durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriften

durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50 - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50 - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50 auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Bei der Arbeit an der vorliegenden Erfindung konnte festgestellt werden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des sigH-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

- Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des
- 5 Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Aminosäure-Produktion zu
- 10 steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit
- 15 unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.
- 20 Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen
- 25 Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung
- 30 WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in
- 35 bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße sigH-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche 5 bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHSG2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere 10 Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

15 Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur 20 Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise 25 pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma 30 Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al., 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird 35 anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode

der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, neben dem sigH-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphatzzyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Aminosäuren zusätzlich zur Verstärkung des sigH-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydripicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),

- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),
 - das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mgo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 5 254, 395-403 (1998)),
 - das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512; EP-B-0387527; EP-A-0699759),
 - das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222),
 - das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP-A 0131171),
 - das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-15 8072)) oder das für eine "feed back resistente" Threonin-Dehydratase kodierende Allel ilvA(Fbr) (Möckel et al., (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842),
 - das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierenden Gen ilvBN (EP-B 0356739),
 - 20 • das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen ilvD (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1973-1979),
 - das für das Zwal-Protein kodierende Gen zwal (DE: 19959328.0, DSM 13115)
- 25 verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des sigH-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
 - das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478; DSM 12969),
- 5 • das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE: 1995 1975.7; DSM 13114),
- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2 (DE: 19959327.2, DSM 13113)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

- 10 Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise
- 15 einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.
- 20 Durch die Maßnahmen der Abschwächung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen auf 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10% oder 0 bis 5% der Aktivität oder Konzentration des Wildtyp-Proteins, beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus, herabgesenkt.

- 25 Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Überexpression des sigH-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder 5 repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik 10 (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen 15 von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie 20 z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische 25 Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff 30 oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

- Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.
- Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Ionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei

Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren.

5 Folgende Mikroorganismen wurde als Reinkultur bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

- 10
- Escherichia coli DH5 α mcr/pEC-XK99EsigHalex als DSM 14374 am 29. Juni 2001
 - Corynebacterium glutamicum DSM5715/pEC-XK99E als DSM13455 am 17. April 2000.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

15 Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

20 Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

25 Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

Chromosomal DNA aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI

- (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell
gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer
Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland,
5 Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)
dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1
(Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of
Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma
Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1
10 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem
Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg,
Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02)
gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase
dephosphoryliert.
- 15 Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym
BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.
Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der
behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-
20 DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04)
behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit
Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La
Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing
25 Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.
- Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al.
1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen
in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der
Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der
30 Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular
Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor)
beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar
(Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin
ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C
35 wurden rekombinante Einzelklone selektiert.

Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZero1-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 621 Basenpaaren, welches als sigH-Gen bezeichnet wurde. Das sigH-Gen kodiert für ein Protein von 206 Aminosäuren.

Beispiel 3

Herstellung des Shuttle- Expressionsvektors pEC-XK99EsigHalex zur Verstärkung des sigH-Gens in C. glutamicum

3.1 Klonierung des sigH-Gens

Aus dem Stamm ATCC 13032 nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817-1828 (1994)) chromosomal DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für C. glutamicum

bekannten Sequenz des sigH-Gens wurden die folgenden Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion ausgewählt (siehe SEQ ID No. 3 und SEQ ID No. 4):

sigHex1:

5` ca ggt acc-ttt tcg aaa ggg gcc aca tg 3`

sigHex2:

5` tg tct aga-aag aat tca ggg cag cca ca 3`

Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der

10 Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit Pwo-Polymerase der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) die PCR Reaktion durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ermöglichen die Primer
15 die Amplifikation eines 712 bp großen DNA-Fragmentes, welches das sigH-Gen trägt. Außerdem enthält der Primer sigHex1 die Sequenz für die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease KpnI, und der Primer sigHex2 die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease XbaI, die in der
20 oben dargestellten Nukleotidabfolge durch Unterstrichen markiert sind.

Das 712 bp große sigH-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und XbaI gespalten und anschließend aus dem Agarosegel mit dem QiaExII Gel

25 Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany) isoliert.

3.2 Konstruktion des Shuttle - Vektors pEC-XK99E

Nach dem Stand der Technik wurde der E. coli - C. glutamicum Shuttle - Vektor pEC-XK99E konstruiert. Der

30 Vektor enthält die Replikationsregion rep des Plasmids pGA1 einschließlich des Replikationseffectors per (US-A-5,175,108; Nesvera et al., Journal of Bacteriology 179, 1525-1532 (1997)), das Kanamycin-Resistenzgen aph(3')-IIa

aus Escherichia coli (Beck et al. (1982), Gene 19: 327-336), den Replikationsursprung, den trc-Promotor, die Terminationsregionen T1 und T2, das lacI^q-Gen (Repressor des lac-Operons von E.coli) und eine

- 5 Mehrfachklonierschnittstelle (multiple cloning site, mcs) (Norlander, J.M. et al. Gene 26, 101-106 (1983)) des Plasmids pTRC99A (Amann et al. (1988), Gene 69: 301-315).

Der trc-Promotor kann durch Zugabe des Lactose-Derivates IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induziert werden.

- 10 Der konstruierte E. coli - C. glutamicum Shuttle - Vektor pEC-XK99E wurde mittels Elektroporation (Liebl et al., 1989, FEMS Microbiology Letters, 53:299-303) in C. glutamicum DSM5715 transferiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf LBHIS Agar bestehend aus 18,5
15 g/l Brain-Heart Infusion Boullion, 0,5 M Sorbitol, 5 g/l Bacto-Trypton, 2,5 g/l Bacto-Yeast-Extract, 5 g/l NaCl und 18 g/l Bacto-Agar, der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Die Inkubation erfolgte für 2 Tage bei 33°C.

- Plasmid DNA wurde aus einer Transformante nach den üblichen
20 Methoden isoliert (Peters-Wendisch et al., 1998, Microbiology, 144, 915 - 927), mit der Restriktionsendonuklease HindIII geschnitten und das Plasmid durch anschließende Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

- 25 Das so erhaltene Plasmidkonstrukt wurde als pEC-XK99E (Figur 1) bezeichnet. Der durch Elektroporation des Plasmides pEC-XK99E in den C. glutamicum-Stamm DSM5715 erhaltene Stamm wurde DSM5715/pEC-XK99E genannt und als
30 DSM13455 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt.

3.3 Klonierung von sigH in den E. coli-C. glutamicum
Shuttle Vektor pEC-XK99E

Als Vektor wurde der in Beispiel 3.2 beschriebene E. coli - C. glutamicum Shuttle-Vektor pEC-XK99E verwendet. DNA dieses Plasmids wurde mit den Restriktionsenzymen KpnI und XbaI vollständig gespalten und anschließend mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert.

Das in Beispiel 3.1 beschriebene, mittels PCR gewonnene und mit den Restriktionsenonukleasen KpnI und XbaI gespaltene ca. 700 bp große sigH-Fragment wurde mit dem vorbereiteten Vektor pEC-XK99E gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,

Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no.27-0870-04) behandelt. Der Ligationsansatz wurde in den E. coli Stamm DH5 α mcr (Hanahan, In: DNA cloning. A practical approach. Vol. I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA) transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Kanamycin. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektiert. Plasmid DNA wurde aus einer Transformante mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit den Restriktionsenzymen XbaI und KpnI gespalten, um das Plasmid durch anschließende Agarosegel-Elektrophorese zu überprüfen. Das erhaltene Plasmid wurde pEC-XK99EsigHalex genannt. Es ist in Figur 2 dargestellt.

Beispiel 4

Transformation des Stammes DSM5715 mit dem Plasmid pEC-XK99EsigHalex

Der Stamm DSM5715 wurde mit dem Plasmid pEC-XK99EsigHalex
5 unter Anwendung der von Liebl et al., (FEMS Microbiology Letters, 53:299-303 (1989)) beschriebenen Elektroporationsmethode transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf LBHIS Agar bestehend aus 18,5 g/l Brain-Heart Infusion Boullion, 0,5 M Sorbitol, 5 g/l
10 Bacto-Trypton, 2,5 g/l Bacto-Yeast-Extract, 5 g/l NaCl und 18 g/l Bacto-Agar, der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Die Inkubation erfolgte für 2 Tage bei 33°C.

Plasmid DNA wurde aus einer Transformante nach den üblichen Methoden isoliert (Peters-Wendisch et al., 1998,
15 Microbiology, 144, 915 - 927), mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und KpnI geschnitten und das Plasmid durch anschließende Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Der erhaltene Stamm wurde DSM5715/pEC-XK99EsigHalex1 genannt.

20 Beispiel 5

Herstellung von Lysin

Der in Beispiel 4 erhaltene C. glutamicum Stamm DSM5715/pEC-XK99EsigHalex wurde in einem zur Produktion von Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Lysingehalt
25 im Kulturüberstand bestimmt.

Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz-Agar mit Kanamycin (25 mg/l)) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet.

Medium Cg III

NaCl 2,5 g/l

Bacto-Pepton 10 g/l

Bacto-Yeast-Extrakt 10 g/l

Glucose (getrennt autoklaviert) 2% (w/v)

Der pH-Wert wurde auf pH 7.4
eingestellt

Diesem wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur
wurde 16 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler
5 inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur
angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660nm) der Hauptkultur
0,1 betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM
verwendet.

Medium MM

CSL (Corn Steep Liquor) 5 g/l

MOPS (Morpholinopropansulfonsäure) 20 g/l

Glucose (getrennt autoklaviert) 50 g/l

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25 g/l

KH_2PO_4 0,1 g/l

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 1,0 g/l

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ 10 mg/l

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 10 mg/l

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5,0mg/l

Biotin (sterilfiltriert) 0,3 mg/l

Thiamin * HCl (sterilfiltriert) 0,2 mg/l

L-Leucin (sterilfiltriert) 0,1 g/l

CaCO_3 25 g/l

CSL, MOPS und die Salzlösung wurden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend wurden die
 5 sterilen Substrat- und Vitaminlösungen zugesetzt, sowie das trocken autoklavierte CaCO_3 .

Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) und IPTG (1mM/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte
 10 bei 33°C und 80% Luftfeuchte.

Nach 72 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete Lysinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD (660 nm)	Lysin-HCl g/l
DSM5715	6,9	13,26
DSM5715/pEC-XK99EsigHalex	10,0	14,25

10

Kurze Beschreibung der Figuren:

Figur 1: Karte des Plasmids pEC-XK99E

Figur 2: Karte des Plasmids pEC-XK99EsigHalex

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung:

Kan:	Kanamycin Resistenz-Gen $\text{aph}(3')\text{-IIa}$ aus <i>Escherichia coli</i>
HindIII	Schnittstelle des Restriktionsenzyms HindIII
XbaI	Schnittstelle des Restriktionsenzyms XbaI
KpnI	Schnittstelle des Restriktionsenzyms KpnI
Ptrc	trc-Promotor
T1	Terminationsregion T1
T2	Terminationsregion T2

15

per Replikationseffektor per
rep Replikationregion rep des Plasmides pGA1
lacIq lacIq-Repressor des lac-Operons von
 Escherichia coli
sigH kloniertes sigH-Gen

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

5 <120> Neue für das sigH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000447 BT

10 <140>

10 <141>

<160> 4

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

15 <210> 1

<211> 1148

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

20 <220>

<221> CDS

<222> (302)..(919)

<223> sigH-Gen

25 <400> 1

ttgttgatgg ctgtggctaa atcatcgta tctttgggc gtaatcgatg ccaaaatg 60

30 aggtcacqgc gattagtctc aacaatttcg gtgcttaag gatcctgcgg attattgac 120

gtgaagtaga acattgttcc cccctagatt tgaagtggta catatgttct aactgatgt 180

gtggacacgc ggggtagag taaaatctaa gcaacagctc acgtggctt acagctaccc 240

35 ccgaaaggc tgtttttat cgaaatgata atagtcacca cgcatttcg aaaggggcca 300

c atg gct gaa aac cga acc ggc aca gtc gat gga gac gcg ttg gct gcc 349
 Met Ala Glu Asn Arg Thr Gly Thr Val Asp Gly Asp Ala Leu Ala Ala
 1 5 10 15

40 cgc ttt gaa gag gac ctg cca ctc ctt gac cag ctc tat ggc ggt 397
 Arg Phe Glu Glu Ala Leu Pro Leu Leu Asp Gln Leu Tyr Gly Gly
 20 25 30

45 gct ctg cgc atg act aga aat ccc gca gat gcg gaa gat ctc gtg caa 445
 Ala Leu Arg Met Thr Arg Asn Pro Ala Asp Ala Glu Asp Leu Val Gln
 35 40 45

50 gac acc tat atc aag gcg tac cag gcg ttc gcg agc ttc aaa cca ggc 493
 Asp Thr Tyr Ile Lys Ala Tyr Gln Ala Phe Ala Ser Phe Lys Pro Gly
 50 55 60

55 acc aac ctg aag gct tgg ctc tat cgg atc atg acg aat acc tac atc 541
 Thr Asn Leu Lys Ala Trp Leu Tyr Arg Ile Met Thr Asn Thr Tyr Ile
 65 70 75 80

aac atg tac cga aag aaa cag agg cag cca tcg caa acc tct gcc gat 589
 Asn Met Tyr Arg Lys Lys Gln Arg Gln Pro Ser Gln Thr Ser Ala Asp
 85 90 95

	gag atc act gac tac cag ctc gtt gaa tct caa tcg cat acc tca aca Glu Ile Thr Asp Tyr Gln Leu Val Glu Ser Gln Ser His Thr Ser Thr 100 105 110	637
5	ggg ctg gaa tcc gcc gag gtt gag gct ctg aaa aat ctg cca gac gga Gly Leu Glu Ser Ala Glu Val Glu Ala Leu Lys Asn Leu Pro Asp Gly 115 120 125	685
10	aaa att ggc gat gca atg aat caa ctc agc ccg gaa tac cg ^g atg gtg Lys Ile Gly Asp Ala Met Asn Gln Leu Ser Pro Glu Tyr Arg Met Val 130 135 140	733
15	gtt tat tat gcc gat gta gaa gat ctc gca tac aaa gaa atc gcc gag Val Tyr Tyr Ala Asp Val Glu Asp Leu Ala Tyr Lys Glu Ile Ala Glu 145 150 155 160	781
20	atc atg gac gtt cca ctc gga act gtg atg tcc cga ctc cat cgt gga Ile Met Asp Val Pro Leu Gly Thr Val Met Ser Arg Leu His Arg Gly 165 170 175	829
25	aga aaa cag ctc cga gga atg tta aag gaa gta gc ^g aag gaa caa ggc Arg Lys Gln Leu Arg Gly Met Leu Lys Glu Val Ala Lys Glu Gln Gly 180 185 190	877
30	att ggt ctt gaa cat ccc gac atg aag aaa aat tcg gag gca Ile Gly Leu Glu His Pro Asp Met Lys Lys Asn Ser Glu Ala 195 200 205	919
35	taacgatgac gaatctcaac cgcgcgact cgcaaggta ttgtggctgc cctgaattct 979 tcgatgaaat gtatcagcta ctcgacgatc aactcagcga gtccgcctgc gagcgtctgc 1039 gtattcacgc ggcaggctgc ccggcatgcc agcaactgct agaggccgaa tcggagttc 1099 gtagtctgtt gcgcaagtgc tgctgcgaat cggcacctgt ggagctccg 1148	
40	<210> 2 <211> 206 <212> PRT <213> Corynebacterium glutamicum	
45	<400> 2 Met Ala Glu Asn Arg Thr Gly Thr Val Asp Gly Asp Ala Leu Ala Ala 1 5 10 15	
50	Arg Phe Glu Glu Glu Ala Leu Pro Leu Leu Asp Gln Leu Tyr Gly Gly 20 25 30	
55	Ala Leu Arg Met Thr Arg Asn Pro Ala Asp Ala Glu Asp Leu Val Gln 35 40 45	
	Asp Thr Tyr Ile Lys Ala Tyr Gln Ala Phe Ala Ser Phe Lys Pro Gly 50 55 60	
	Thr Asn Leu Lys Ala Trp Leu Tyr Arg Ile Met Thr Asn Thr Tyr Ile 65 70 75 80	

	Asn Met Tyr Arg Lys Lys Gln Arg Gln Pro Ser Gln Thr Ser Ala Asp			
	85	90	95	
5	Glu Ile Thr Asp Tyr Gln Leu Val Glu Ser Gln Ser His Thr Ser Thr			
	100	105	110	
	Gly Leu Glu Ser Ala Glu Val Glu Ala Leu Lys Asn Leu Pro Asp Gly			
	115	120	125	
10	Lys Ile Gly Asp Ala Met Asn Gln Leu Ser Pro Glu Tyr Arg Met Val			
	130	135	140	
15	Val Tyr Tyr Ala Asp Val Glu Asp Leu Ala Tyr Lys Glu Ile Ala Glu			
	145	150	155	160
	Ile Met Asp Val Pro Leu Gly Thr Val Met Ser Arg Leu His Arg Gly			
	165	170	175	
20	Arg Lys Gln Leu Arg Gly Met Leu Lys Glu Val Ala Lys Glu Gln Gly			
	180	185	190	
	Ile Gly Leu Glu His Pro Asp Met Lys Lys Asn Ser Glu Ala			
	195	200	205	
25				
	<210> 3			
	<211> 28			
	<212> DNA			
30	<213> Künstliche Sequenz			
	<220>			
	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer			
	sigHex1			
35				
	<400> 3			
	caggtacctt ttcgaaaggg gccacatg		28	
40				
	<210> 4			
	<211> 28			
	<212> DNA			
	<213> Künstliche Sequenz			
45				
	<220>			
	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer			
	sigHex2			
50				
	<400> 4			
	tgtctagaaa gaattcaggg cagccaca		28	

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das sigH-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
 - 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c), wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Sigma-Faktors H aufweist.
- 20 2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
- 25 4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
 - 5 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
 - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß die Hybridisierung von Sequenz (iii) unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird
- 10 7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, die für ein Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2 dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
- 15 8. Coryneform Bakterien, in denen das sigH-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert wird.
9. Escherichia coli Stamm DH5 α mcr/pEC-XK99EsigHalex als DSM 14374 hinterlegt bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, Braunschweig, Deutschland.
- 20 10. Corynebacterium glutamicum Stamm DSM5715/pEC-XK99E als DSM13455 hinterlegt bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, Braunschweig, Deutschland.
- 25 11. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere Lysin, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte durchführt:
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das sigH-Gen oder dafür kodierende

Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert;

b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und

5 c) Isolierung der L-Aminosäure.

12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

10

15

13. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.

20

14. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor die für das sigH-Gen kodierende Nukleotidsequenz trägt.

25

15. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e), das (die) für das sigH-Gen kodiert (kodieren) verstärkt, insbesondere überexprimiert.

30

16. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man die regulatorischen Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) erhöht, für das das Polynukleotid sigH kodiert.

17. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch
gekennzeichnet, daß man zur Herstellung
von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen
fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder
mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 5 17.1 das für die Dihydripicolinat-Synthase
 kodierende Gen dapA,
- 10 17.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat
 Dehydrogenase kodierende Gen gap,
- 17.3 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende
Gen tpi,
- 17.4 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende
Gen pgk,
- 17.5 das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
kodierende Gen zwf,
- 17.6 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen
pyc,
- 17.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase
kodierende Gen mqo,
- 20 17.8 das für eine feed-back resistente
Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- 17.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
- 17.10 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende
Gen hom,
- 25 17.11 das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen
ilvA oder das für eine feed back resistente
Threonin-Dehydratase kodierende Allel
ilvA(Fbr),

- 17.12 das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierende Gen ilvBN,
- 17.13 das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen ilvD,
- 5 17.14 das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwa1 verstärkt bzw. überexprimiert.
18. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 10 18.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck,
- 18.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi,
- 15 18.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB
- 18.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2 abschwächt.
19. Coryneformen Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
- 20 20. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 11-18, dadurch gekennzeichnet, daß man Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium einsetzt.
- 25 21. Verfahren gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man den Corynebacterium glutamicum Stamm DH5 α mcr/pEC-XK99EsigHalex einsetzt.

22. Verfahren gemäß Anspruch 20, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man den
Corynebacterium glutamicum Stamm DSM5715/pEC-XK99E
einsetzt.

5 23. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene
zu isolieren, die für den Sigma-Faktor H kodieren oder
eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des sigH-Gens
aufweisen, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
10 daß man das Polynukleotid, enthaltend die
Polynukleotidsequenzen gemäß Anspruch 1, 2, 3 oder 4
als Hybridisierungssonden einsetzt.

15 24. Verfahren gemäß Anspruch 23, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man arrays, micro
arrays oder DNA-chips einsetzt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% 10 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das sigH-Gen verstärkt vorliegt, und die 20 Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.

Figur 1: Karte des Plasmides pEC-XK99E

5

10

15

20

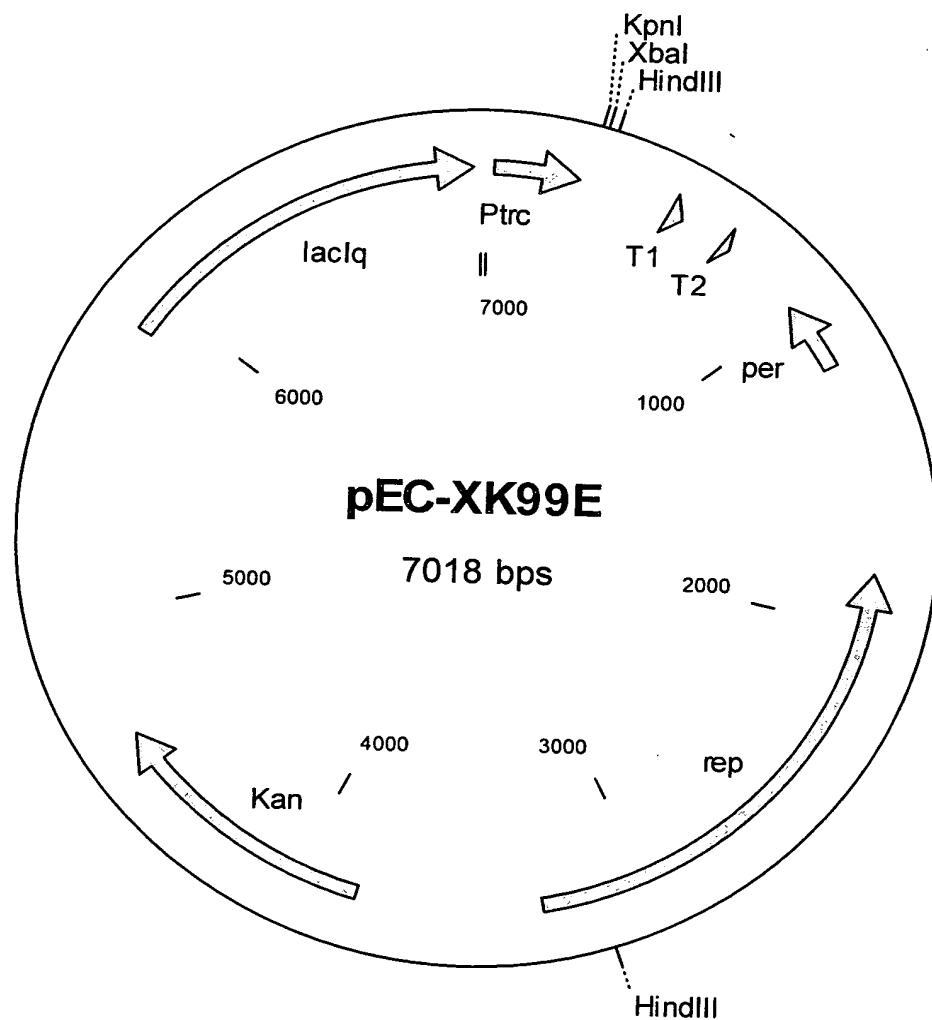
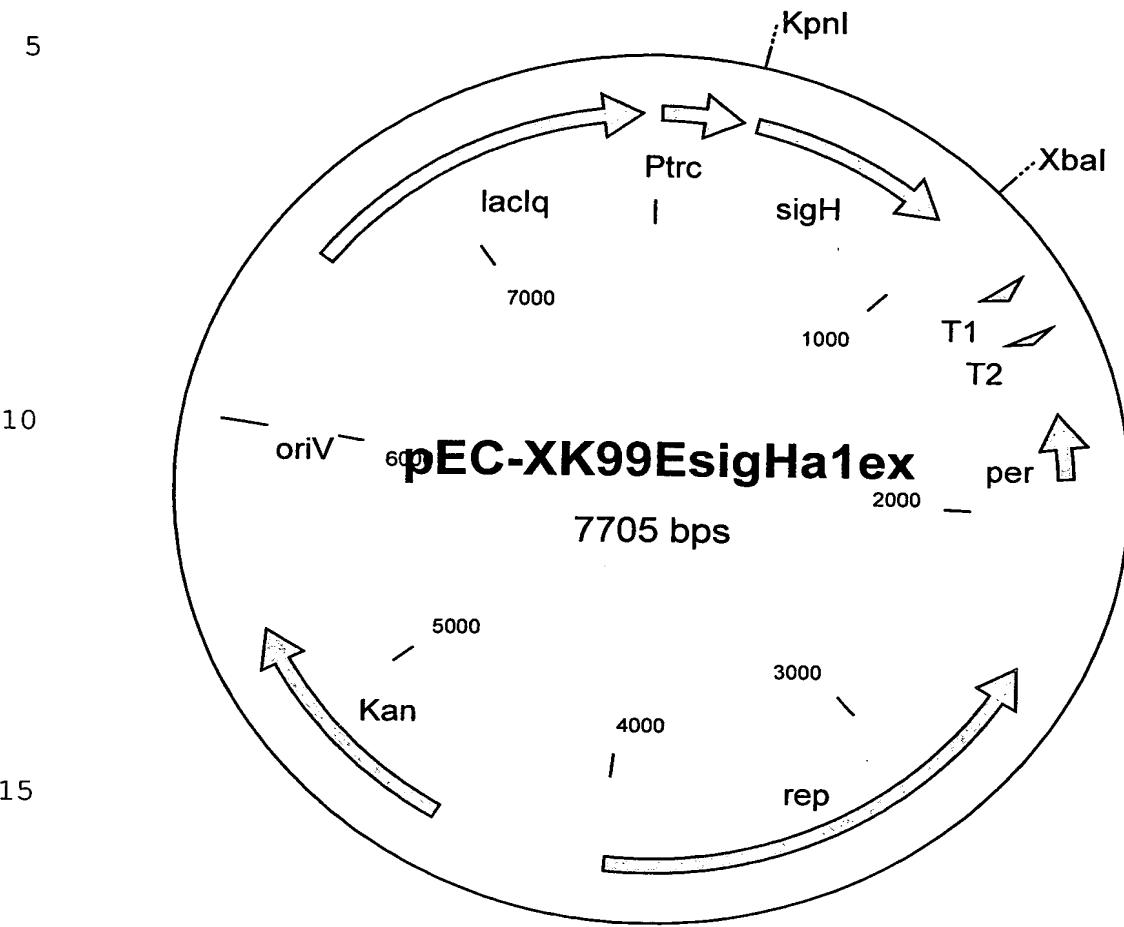


Figure 2: Plasmid pEC-XK99EsigHalex





Creation date: 09-15-2003
Indexing Officer: HNGUYEN32 - HUNG NGUYEN
Team: OIPEBackFileIndexing
Dossier: 09942936

Legal Date: 12-18-2001

No.	Doccode	Number of pages
1	A...	1
2	REM	1
3	LET.	1
4	XT/	4
5	SEQLIST	1
6	OATH	3
7	CRFL	2
		1

Total number of pages: 13

Remarks:

Order of re-scan issued on